

UUSI IHOHAAVAAN HAKEUTUVA PEPTIDI HAKEUTUU MYÖS NORMAALIIN IHOON

Toini Valmari
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Marraskuu 2015

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Kliinisen anatomian tutkimusryhmä

VALMARI TOINI: UUSI IHOHAAVAAN HAKEUTUVA PEPTIDI HAKEUTUU MYÖS NORMAALIIN IHOON

Kirjallinen työ, 21 s.
Ohjaaja: professori Tero Järvinen

Marraskuu 2015

Avainsanat: ihohaava, arpeutuminen, bakteriofagi, kudokseen hakeutuva peptidi

Ihohaavan paraneminen voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, jotka ilmenevät osittain päällekkäisinä. Nämä vaiheet saavat aikaan verenvuodon tyrehtymisen, uudisverisuonten kasvun ja uuden kudoksen muodostumisen haava-alueelle. Tulehdusreaktio on merkittävässä roolissa paranemisen alkuvaiheessa.

Ihoon tullut haava paranee parhaassakin tapauksessa arpeutumalla. Arven mekaaniset ominaisuudet jäävät heikommiksi kuin ehjän ihon. Arpeutumista on yritetty estää useilla menetelmillä. Yksi niistä on menetelmä, jossa dekoriini-proteiinia annostellaan verenkiertoon ja kuljetetaan ihohaavaan spesifisesti sinne hakeutuvan peptidin avulla.

Ihohaavaan muodostuvissa uudisverisuonissa ja myös muissa kehon verisuonissa on havaittu olevan kudokselle tyypillisiä, ainutlaatuisia molekyylirakenteita, joita kutsutaan verisuoniston kudosspesifisiksi sormenjäljiksi. Verisuonistossa on siis postinumeroijärjestelmää vastaava systeemi. On löydetty postinumeroita hyödyntäviä peptidejä, jotka kykenevät hakeutumaan haluttuun kudokseen. Osa näistä peptideistä pystyy myös tunkeutumaan verisuonen seinämän solujen läpi kudokseen. Tällaisia peptidejä kutsutaan soluja läpäiseviksi peptideiksi (cell penetrating peptides).

Ihohaavaan hakeutuvia peptidejä voidaan seuloa bakteriofagikirjastomenetelmällä. Bakteriofagi on todellinen lääkekehityksen voimahahmo, jonka solukalvolla voidaan ilmentää miljardeja proteiineja tai peptidijaksoja ja seuloa näitä lyhyessä ajassa. *in vivo* phage display -menetelmässä bakteriofagikirjasto injektoidaan verenkiertoon ja siitä seulotaan kohdekudokseen hakeutuvia peptidejä. Tarkoituksena on löytää lisää mahdollisia lääkeaineiden kuljettimia kohdekudoksiin kohdennettua lääkehoitoa varten. Tässä tutkimuksessa tutkittiin muutaman aiempien analyysien pohjalta valitun peptidin kykyä hakeutua ihohaavaan.

Tutkimuksessa löydettiin uusi peptidi, joka kykenee hakeutumaan ihohaavaan ja ehjään ihoon. Jatkotutkimuksia tarvitaan sen selvittämiseksi, pystyykö tämä peptidi tunkeutumaan kudoksiin.

Sisällys

1. Johdanto.....	3
1.1 Ihohaavan paraneminen.....	3
1.2 Angiogeneesin säätely ja ihohaavan uudisverisuonet.....	7
1.3 Verisuoniston postinumerot.....	9
2. Aineistot ja menetelmät.....	11
3. Tulokset.....	12
3.1 Peptidien kloonaminen.....	12
3.2 Alustava analyysi.....	12
3.3 Hakeutuminen ihohaavaan.....	13
3.4 Kontrollielimet.....	15
4. Pohdinta.....	16
4.1 Arpeutuminen.....	17
4.2 Menetelmän sovelluksia.....	18
Viitteet.....	19

1. Johdanto

1.1 Ihohaavan paraneminen

Ihohaavan paraneminen voidaan jakaa karkeasti kolmeen vaiheeseen: tulehdusvaihe (inflammation), solujen lisääntymisvaihe (proliferation) ja uudelleenmuovautumisvaihe (remodeling) (Nauta ym. 2011, Li ym. 2007, Johnstone ym. 2005). Myös haavan syntymistä välittömästi seuraava veren hyytyminen eli hemostaasi voidaan ajatella kuuluvaksi haavan paranemisprosessiin (Li ym. 2007). Eri vaiheet haavan paranemisessa ovat osittain päällekkäisiä ja limittäisiä (Nauta ym. 2011, Li ym. 2007). Kroonisissa haavoissa paranemisprosessi on tyypillisesti häiriintynyt, ja saman haavan eri alueet ovat keskenään eri vaiheissa paranemista (Li ym. 2007).

Hemostaasivaiheessa verihiutaleet ovat keskeisessä roolissa. Ne aktivoituvat kohdatessaan soluväliaineen proteiineja kuten kollageenia ja fibronectiiniä. Aktivoituneet verihiutaleet takertuvat toisiinsa. Takertuminen saa aikaan sen, että veressä oleva entsyymi nimeltä Hagemanin tekijä XII käynnistää fibrinihiyytymän muodostumiseen päättyvän entsyymiketjun. Myös kudostekijä (tissue factor) saa aikaan tapahtumaketjun, jonka lopputuloksena syntyy fibriniä. Vaurioituneen kudoksen solujen solukalvolla oleva kudostekijä joutuu kosketuksiin veren kanssa; myös aktivoituneet makrofagit ilmentävät kudostekijää pinnallaan. Fibrinin muodostumiseen tähtääviä reittejä on siis kaksi: verihiutaleiden aktivaatio (sisäinen tekijä) sekä kudosaaurio

(ulkoinen tekijä). (Li ym. 2007.) Muodostunut fibriini tukee toisiinsa takertuneita verihiutaleita, jotta virtaava veri ei työnnä niitä erilleen (Johnstone ym. 2005). Verihiutaleiden ja fibriinin muodostama hyyytymä toimii väliaikaisena mekaanisena suojana haavalle sekä tukiverkkona, jota pitkin solut liikkuvat paranemisprosessin aikana (Li ym. 2007, Miller ja Nanchahal 2005).

Haavoissa, joissa ei ole verenvuotoa, parenkymisolut ja komplementti aktivoituvat. Tällöin vapautuu vasoaktiivisia eli verisuonistoon vaikuttavia ja kemotaktisia eli tulehdussoluja houkuttelevia tekijöitä. Verihiutaleiden aktivoituminen ei siis ole välttämätöntä haavan paranemisen kannalta. (Miller ja Nanchahal 2005.)

Aktivoituvista verihiutaleista vapautuvien aineiden joukossa on kasvutekijöitä ja sytokiinejä, joista tärkeimmät ovat transformoiva kasvutekijä β (transforming growth factor β , TGF- β) ja verihiutalekasvutekijä (platelet-derived growth factor, PDGF) (Gieringer ym. 2011). Nämä houkuttelevat tulehdussoluja, epiteelisoluja ja sidekudossoluja eli fibroblasteja paikalle (Gieringer ym. 2011). Tällöin ajatellaan vaurioalueen siirtyvän hemostaasivaiheesta tulehdusvaiheeseen (Miller ja Nanchahal 2005). Siirtyminen vaiheesta toiseen on liukuvaa, sillä samat aineet alkavat jo käynnistää esim. re-epitelisoitumista ja angiogeneesiä tulehdusvaiheen aikana (Miller ja Nanchahal 2005). Akuutin tulehdusvaiheen kestoksi eri lähteissä mainitaan 24 tunnista kolmeen vuorokauteen (Gieringer ym. 2011, Li ym. 2007).

Alkuvaiheessa tärkeimmät tulehdussolut ovat neutrofiilit ja makrofagit (Li ym. 2007). Ne saapuvat paikalle verihiutaleiden erittämien aineiden houkuttelemina (Gieringer ym. 2011) ja siirtyvät kiertävästä verestä vauriokohtaan kapillaarien endoteelisolujen adheesio- eli kiinnittymisproteiinien avustuksella. Neutrofiilien tehtävä on puhdistaa aluetta bakteereista ja tuottaa lisää sytokiinejä, jotka aktivoivat fibroblasteja sekä keratinosyyttejä. (Miller ja Nanchahal 2005.) Neutrofiileista vapautuu metalloproteiinaaseja ja kollagenaaseja, jotka pilkkovat soluväliainetta (Nauta ym. 2011). Veren monosyytit erilaistuvat makrofageiksi saapuessaan haavaan hieman neutrofiilien jälkeen (Li ym. 2007, Miller ja Nanchahal 2005).

Makrofagien ajatellaan olevan tärkeimpiä tulehdusvaiheen soluja. Ne fagosytoivat patogeenejä, poistavat kudoksen hajoamisesta syntyneitä nekroottista, kuollutta kudosta ja neutrofiileja sekä vapauttavat happiyhdisteitä, entsyymejä, kasvutekijöitä, sytokiinejä ja angiogeenitekijöitä. Makrofagien vapauttatut aineet houkuttelevat paikalle fibroblasteja, mutta niillä on vaikutusta myös solujen lisääntymiseen ja soluväliaineen tuottoon. Mielenkiintoinen yksityiskohta on, että angiogeenitekijöitä vapautuu makrofageista vain vähähappisessa ympäristössä. (Li ym. 2007). Makrofageja pidetään kuitenkin angiogeenin aikaansaamiseksi kriittisinä soluina. Neutrofiilien ja makrofagien lisäksi kudoksessa on auttaja-T-soluja, joiden erittämä sytokiini, interleukiini-2, houkuttelee paikalle lisää T-soluja tehostamaan tulehdusreaktiota (Gieringer ym. 2011).

Makrofagien toiminta aiheuttaa vähitellen sen, että paranemisprosessi siirtyy tulehdusvaiheesta solujen lisääntymisvaiheeseen. Solujen lisääntymisvaiheella on kolme tehtävää: muodostaa uusi läpäisyeste (re-epitelisaatio), palauttaa verenkierto (angiogeneesi) sekä vahvistaa kudoks (fibroplasia). (Li ym.2007) Vaihe alkaa yleensä neljäntenä päivänä vaurion synnyn jälkeen ja kestää kahdesta kolmeen viikkoa (Gieringer ym. 2011).

Re-epitelisaatio alkaa sillä, että keratinosyytit vaeltavat vaurioalueelle. Vaellus alkaa yleensä vuorokauden sisällä vaurion synnystä. Ajatellaan, että nämä keratinosyytit ovat peräisin karvafollikkelissa sijaitsevista epidermisen esisolusta. (Li ym. 2007.) Keratinosyytit liikkuvat haavan reunoilta kohti keskustaa (Miller ja Nanchahal 2005) sukeltaen verihyytymän kautta syntyneen rupikudoksen alle (Singer ja Clark 1999). Jonkin matkan päässä etenevästä rintamasta olevat keratinosyytit lisääntyvät, jotta soluja riittää peittämään koko haava. Päästäkseen etenemään kudoksessa keratinosyyttien täytyy sekä tarttua kiinni ympäristöönsä että kyetä irrottautumaan siitä. Keratinosyytit kiinnittyvät pinta-integriinireseptoreillaan sekä fibriiniin että fibronektiinin muodostamaan verkkoon ja juuri syntyneisiin löyhiin kollageenisäikeisiin. (Li ym. 2007.)

Jotta keratinosyytit pääsevät etenemään, niiden täytyy voida kiinnittymisen lisäksi irrottautua alustastaan. Irrottautumisessa tärkeässä osassa ovat matriksin metalloproteiinaasi -entsyymit, joita keratinosyytit tuottavat. (Miller ja Nanchahal 2005.) Matriksin metalloproteiinaasit hajottavat myös soluväliainetta mahdollistaen näin mm. sen, että keratinosyytti pääsee irtautumaan tyvikalvosta juuri ennen kuin vaellus alkaa (Li ym. 2007). Keratinosyytit tuottavat metalloproteiinaasien lisäksi myös kudospasminogeeniaktivaattoria (tissue plasminogen), joka aktivoi plasmiinin syntymisen plasminogeenista. Plasmiini on tärkein fibriiniverkkoa hajottava entsyymi. (Miller ja Nanchahal 2005.) Keratinosyytit siis hajoittavat edessään olevaan fibriinistä syntynyttä hyytymäverkkoa sitä mukaan kun tunkeutuvat haavakudokseen.

Keratinosyyttien vaellus ja proteiinien tuotto lakkaa, kun haava on peittynyt keratinosyyttikerroksella (Miller ja Nanchahal 2005). Keratinosyyttikerros kiinnittyy alla olevaan kudokseen, muodostaa itselleen tyvikalvon ja jatkaa normaalia toimintaansa eli erilaistumista ihon kerrostuneeksi keratinisoituneeksi levyepiteeliksi. Tyvikalvo muodostuu noin viikon kuluttua re-epitelisaatiosta. (Li ym. 2007.) Tämän jälkeen haavan päällä ollut rupi irtoaa ja pohjalta tulee esiin keratinosyyttien muodostama ehjä epidermis.

Kudoksen vahvistumisessa eli fibroplasiassa tärkein solutyyppi on fibroblasti. Kuten keratinosyytit, myös fibroblastit hakeutuvat vaurioalueelle kasvutekijöiden houkuttelemina (Miller ja Nanchahal 2005). Fibroblastit alkavat jakautua pian vaurion syntymisen jälkeen ja noin neljännen vuorokauden kohdalla lähtevät vaeltamaan kudoksessa. Happamat ja vähähappiset olot haavan keskellä kiihdyttävät fibroblastien jakaantumista. (Li ym. 2007.) Fibroblastit tuottavat alkuvaiheessa runsaasti löyhän sidekudoksen proteiineja kuten tyypin III kollageenia, tenaskiinia ja fibronektiinia. Näistä muodostuu löyhä sidekudos, jota kutsutaan granulaatiokudoksesksi. Osa fibroblasteista erilaistuu myöhemmin supistumiskykyisiksi myofibroblasteiksi,

jotka saavat aikaan ison granulaatiokudoksen muuttumisen pieneksi arpikudokseksi, jolloin haavan pinta-ala pienenee (Li ym. 2007). Reunojen vetäytymistä tapahtuu koko paranemisen ajan (Johnstone ym. 2005).

Suurin osa fibroblasteista tuottaa soluväliaineen rakennemolekyylejä. Alkuvaiheen tärkein molekyyli on fibronektiini, joka toimii vaeltavien solujen kiinnittymiskohtana, sytokiini- ja kasvutekijävarastona, kollageenisäikeiden kiinnittymiskohtana ja osallistuu haavan supistumiseen (Li ym. 2007). Muita tärkeitä molekyylejä ovat kollageeni, elastiini, hepariinisulfaatti, kondroitiinisulfaatti, hyaluronihappo ja tenaskiiniperheen proteiinit. Kaksi viimeksi mainittua osallistuvat re-epitelisaation, soluväliaineen syntymisen ja haavan reunojen vetäytymisen säätelyyn. (Miller ja Nanchahal 2005.)

Kollageeni on fibroblastien tuottamista molekyyleistä tärkein, sillä se vastaa kypsän arven lujuudesta ja toimii varsinaisena soluväliaineen proteiinina senkin jälkeen, kun suuri osa muuntotyypisistä molekyyleistä on uudelleenmuovautumisvaiheessa pilkottu pois (Miller ja Nanchahal 2005). Ensimmäiset kollageenimolekyylit, jotka ovat tyypin III kollageenia, ilmaantuvat jo 48–72 tunnin kuluttua vauriosta. Suurimmillaan tyypin III kollageenin erityys on viidennen ja seitsemännen vuorokauden välillä. (Li ym. 2007.) Tämän jälkeen tyypin III kollageeni korvautuu huomattavasti vahvemmallalla tyypin I kollageenilla, joka antaa arvelle sen vetolujuuden. Vetolujuuden saavuttamiseksi keskeistä on, että kollageenisäikeiden välille syntyy poikittaisia ristisidoksia (cross-linking). Vasta nämä ristisidokset takaavat arpikudoksen vetolujuuden.

Angiogeneesi tarkoittaa sitä, että olemassa olevista verisuonista kasvaa uudisverisuonia. Angiogeneesissä kapillaarisuonten endoteelisolut irtautuvat tyvikalvostaan, liikkuvat kohti hapen puutteessa olevaa kudosta (kuten haava-aluetta), erittävät biologisesti aktiivisia aineita, lisääntyvät, muodostavat putkirakenteita, muodostavat uuden tyvikalvon ja lopulta karsivat pois ylimääräiset suonihaarat. Angiogeneesi muistuttaa keratinosyyttien vaellusta sikäli, että jakautuvat endoteelisolut eivät ole vaeltavien solujen etulinjassa vaan vähän niiden takana. Angiogeneesiä stimuloivat makrofagien vapauttamat sytokiinit, kasvutekijät, kudoksen alhaisesta happipitoisuudesta johtuva jännitys, maitohappo, ja biogeeniset amiinit, joita syntyy haavassa. Paitsi stimuloivia tekijöitä, angiogeneesi tarvitsee myös soluväliainetta kehittyvien suonirakenteiden tueksi. Angiogeneesin hyödyt kudokselle ovat ilmeiset: tulehdussolut, ravinteet ja happi pääsevät veren mukana vaurioalueelle. Hapen lisääntyminen aiheuttaa mm. angiogeneesin vähenemisen ja fibroblastien jakautumisnopeuden hidastumisen, kun vähähappisuudesta johtuva stimulus häviää. (Li ym. 2007.)

Solujen lisääntymisvaiheen seurauksena haavaan syntyvää sidekudosta kutsutaan granulaatiokudokseksi. (Miller ja Nanchahal 2005). Se alkaa muodostua noin kolme tai neljä vuorokautta vaurion syntymisen jälkeen (Li ym. 2007). Granulaatiokudos muodostuu fibroblasteista, myofibroblasteista, soluväliaineesta, muodostuneista verisuonista ja tulehdussoluista (Gieringer ym. 2011, Li ym. 2007), joiden päällä on ohut kerros epidermistä ja tyvikalvo (Gieringer 2011, Miller ja Nanchahal 2005). Granulaatiokudos sisältää kaikki

tarvittavat ainesosat soluväliaineen muodostamiseen (Miller ja Nanchahal 2005). Mekaanisilta ominaisuuksiltaan granulaatiokudos on selvästi heikompaa kuin ehjä iho tai arpikudos (Johnstone ym 2005).

Uudelleenmuovautumista tapahtuu koko paranemisprosessin ajan, mutta varsinaiseksi uudelleenmuovautumisvaiheeksi kutsuttuun vaiheeseen haava siirtyy fibroblastitoiminnan ansiosta (Miller ja Nanchahal 2005). Uudelleenmuovautumisvaiheessa verisuonten määrä vähenee ja granulaatiokudoksen soluväliaineen molekyylit korvautuvat toisilla molekyyleillä (Li ym. 2007). Hyaluronihappo korvaantuu mm. kondroitiinisulfaattilla, dekoriinilla, biglykaanilla ja versikaanilla. Tyypin III kollageenin suhteellinen osuus vähenee ja tilalle muodostuu tyypin I kollageenia. (Gieringer ym. 2011, Miller ja Nanchahal 2005) Lisäksi lisääntymisvaiheessa epäjärjestyksessä ollut kollageeni järjestäytyy säikeiksi ihon jännityslinjojen mukaisesti (Gieringer ym. 2011). Kollageenin kokonaismäärä on suurin 2-3 viikkoa vaurion synnystä, ja hieman yli vuoden kuluttua kollageenin määrä ja eri tyyppien suhteelliset osuudet ovat samat kuin ennen vauriota (Li ym. 2007). Kollageeni lisää huomattavasti vaurioalueen vetolujuutta, mutta parantuneen haavan vetolujuus jää pysyvästi noin 70 prosenttiin siitä, mitä se on vaurioitumattomassa ihossa (Li ym. 2007, Miller ja Nanchahal 2005).

1.2 Angiogeneesin säätely ja ihohaavan uudisverisuonet

Uudisverisuonten muodostumisen eli angiogeneesin tärkeä tehtävä ihohaavassa on tuoda sekä happea ja ravinteita haava-alueelle että toimia tulehdussolujen kulkureittinä. Iskemia stimuloi tulehdusreaktiota (Gieringer 2011, Li ym. 2007, Li ym. 2003, Tonnesen ym. 2000), joten on loogista, että angiogeneesi ja siitä aiheutuva kudoksen happipitoisuuden nousu vaimentaa tulehdusreaktiota ja lopulta myös granulaatiokudoksen muodostumista, kun riittävä määrä granulaatiokudosta on saatu tuotettua (Li ym. 2007). Normaalitilanteessa aikuisen ihmisen verisuonistossa ei tapahdu angiogeneesiä (karvafollikkeleita, kohtua ja munasarjaa lukuun ottamatta), mutta verisuonet ovat kykeneviä käynnistämään sen tarvittaessa (Li ym. 2003). Ihohaavan angiogeneesin merkittävimpiä soluja ovat pieniä verisuonia reunustavat solut eli mikrovaskulaariendoteelisolut, jotka poikkeavat selkeästi elimistön suuria verisuonia reunustavista soluista (Li ym. 2003).

Angiogeneesiä lisääviä eli proangiogeneettisiä tekijöitä on tutkittu paljon, mutta angiogeneesiä vähentävät eli antiangiogeneettiset tekijät tunnetaan huonommin (DiPietro 2013, Bayless ja Johnson 2011). Angiogeneesiä stimuloivia välittäjäaineita ovat mm. sytokiinit, kasvutekijät ja bioaktiiviset lipidit (Bayless ja Johnson 2011). Välittäjäaineista ylivoimaisesti tärkein on verisuonten endoteelin kasvutekijä (vascular endothelial growth factor, VEGF), jota ilman ihohaava ei parane. Angiopoietiinit, fibroblastikasvutekijä (fibroblast growth factor, FGF) ja transformoiva kasvutekijä β (transforming growth factor β , TGF- β) ovat muita keskeisiä angiogeneesikasvutekijöitä (Li ym. 2003).

Soluväliaineen rooli angiogeneesissä on merkittävä. Soluväliaine muodostaa tukirangan, jota pitkin solut pystyvät liikkumaan, sekä toimii kasvutekijöiden varastona ja säätelijänä (Li ym. 2003). Soluväliaineen proteiinit, joihin endoteelisolut ovat kosketuksissa, säätelevät solujen liikkumista ja kiinnittymistä alustaansa (Bayless ja Johnson 2011). Se, että solun vieressä on soluväliainetta, eikä toinen solu, on olennaista uusien verisuonten kasvun kannalta (Li ym. 2003).

Tulehdusvaiheessa välittäjäaineet, kuten VEGF lisäävät lähistöllä olevien verisuonten läpäisevyyttä. Niiden seinämiin kertyy runsas määrä fibriiniä ja lisäksi niistä vuotaa kudokseen fibriiniä ja fibronektiiniä (Tonnesen ym. 2000). Hieman tämän jälkeen näistä verisuonista versoo kapillaareja pian muodostuvaan granulaatiokudokseen (Tonnesen ym. 2000). Eri tutkimuksissa on havaittu endoteelisolujen muodostavan putkimaisia rakenteita kolmiulotteisen kasvualustan sisällä kasvaessaan ja levymäistä pintaa kaksikulotteisella kasvualustalla (Li ym. 2003, Tonnesen ym. 2000). Fibriini vaikuttaa olevan tärkeässä roolissa putkimaisten rakenteiden kehittämisessä, mistä voidaan päätellä, että angiogeneesi alkaa jo ennen kuin fibriinihyttymä hajotetaan (Tonnesen ym. 2000).

Kun kollageenin määrä granulaatiokudoksessa lisääntyy, kapillaarien määrä haava-alueella vähenee. Suurin osa uudisverisuonista kuolee apoptoottisesti eli ohjelmoidun solukuoleman kautta, ja jäljelle jääviin suoniin muodostuu tiivis tyvikalvo aiemman väliaikaisen ja helposti läpäistävän tyvikalvon sijaan. (Tonnesen ym. 2000.) Perinteisesti on ajateltu, että parantuakseen haava tarvitsee runsaasta uudisverisuonitusta. Viime aikoina on saatu viitteitä, että vähäisempi määrä suonitusta riittää hyvin paranemiseen ja että runsas uudisverisuonten määrä saattaa olla yhteydessä arven muodostumiseen (DiPietro 2013).

Alkuvaiheessa syntyvät uudisverisuonet eroavat vakaan vaiheen verisuonista eli sellaisista suonista, jotka ovat olleet jo pitkään samassa paikassa. Alkuvaiheen uudisverisuonten on havaittu olevan mutkikkaita, vuotavia ja ne kuljettavat verta huonosti (DiPietro 2013). Kasvainkudoksen muodostumisen ja sen uudisverisuonten on havaittu muistuttavan haavan paranemista (Hughes 2008, Tonnesen ym. 2000).

Kasvainten verisuonet ovat mutkikkaita ja vuotavia, niiden läpimitta vaihtelee ja seinämät ovat ohuita (Ruoslahti ym. 2010, Ruoslahti 2002a). Kasvainten verisuonten ja normaalin verisuoniston molekyylit poikkeavat toisistaan. Tämä johtuu pääasiassa siitä, että kasvainten verisuonissa on paljon angiogeneesiin liittyviä molekyylimerkkejä, jotka itse asiassa ovat yhteisiä hyvälaatuisten uudisverisuonten (kuten ihohaavan uudisverisuonten) kanssa. Kasvainten verisuonista tunnistettuja spesifisesti ilmentyviä proteiineja ovat VEGF:n reseptorit, tietyt integriinit (kuten $\alpha\beta3$ ja $\alpha\beta5$), EPH-reseptorit, endogliini (joka sitoo TGF- β :a), aminopeptidaasi N ja matriksin metalloproteinaasit. (Ruoslahti 2002a.) Ihohaavan uudisverisuonissa on havaittu samoja integriineja kuin kasvainten ihohaavoissa (mm. $\alpha\beta3$ ja $\alpha\beta5$) (Li ym. 2003, Tonnesen ym. 2000). Ihohaavojen angiogeneesin tärkeitä merkkiaineita ovat mm. VEGF ja TGF- β .

1.3 Verisuoniston postinumerot

Ihohaavan ja kasvainten uudisverisuonissa on sellaisia mm. angiogeneesiin liittyviä molekyylejä, joita ei ole terveen kudoksen vakaan vaiheen verisuonissa. Näitä molekyylarisia merkkejä kutsutaan verisuoniston postinumeroiksi. Postinumeroiden avulla voidaan kuljettaa lääkeaineita haluttuihin kudoksiin (Järvinen 2013, Porkka ja Laakkonen 2002, Ruoslahti 2002b, Ruoslahti ja Rajotte 2000, Ruoslahti 2000). On havaittu, että yhdistämällä lääkeaine kohdekudokseen hakeutuvaan molekyyliin saadaan aikaan tehokkaampi vaikutus kuin annostelemalla elimistöön yhtä suuri tai suurempi määrä pelkkää lääkeainetta (Toba ym. 2014, Järvinen ja Ruoslahti 2010). Lääkeainetta tarvitaan siis vähemmän, jolloin sivuvaikutusten voi odottaa jäävän vähäisemmiksi tai ehkä jopa kokonaan pois (Ruoslahti ym. 2010, Ruoslahti ja Rajotte 2000).

Verisuoniston postinumeroita voidaan tutkia bakteriofageihin perustuvan seulontamenetelmän avulla. Bakteriofagi koodataan ilmentämään esim. tutkittavaa proteiinin palasta, peptidiä, tai vasta-ainetta osana kalvoproteiinia. Kloonaamalla valtava määrä peptidejä eri bakteriofageihin, saadaan aikaan peptidikirjasto. *in vivo* phage display -menetelmässä kirjasto annostellaan systeemisesti laskimoon. Bakteriofagien annetaan kiertää verenkierrossa, jonka jälkeen verisuonistosta huuhdellaan pois veri ja sen mukana kiertävät bakteriofagit (perfuusio). Sekä kohde- että ns. kontrollikudokset irrotetaan, hajotetaan ja niissä olevat bakteriofagit eristetään. Bakteriofagit ovat tässä vaiheessa yhä toimintakykyisiä, joten kudoksesta eristettyjen bakteriofagien määrä on helppo selvittää bakteerien avulla. Eristetyt bakteriofagit voidaan myös monistaa bakteerien avulla ja injektoida uudestaan verenkiertoon, jolloin kierros kierrokselta kirjastosta putoaa pois bakteriofageja, joiden pinnalle ilmennetty peptidi ei sitoudu haluttuun kudokseen. Menetelmää voidaan käyttää myös yksittäisten peptidien keskinäiseen vertailuun injektoidamalla verenkiertoon vain yhtä peptidiä ilmentäviä bakteriofageja ja vertailemalla eri koe-eläimistä eristettyjen bakteriofagien määriä keskenään. Lisää menetelmästä voi lukea esimerkiksi Järvisen (2012) ja Teesalun ym. (2012) julkaisuista.

Bakteriofagiseulonnan etuna on, että sillä voidaan tutkia koko elimistöä yhtä aikaa *in vivo*. Menetelmällä voidaan tunnistaa proteiinien ja muiden molekyylien interaktiivisia alueita vaikei ennalta tiedetä, minkälainen interaktio on kyseessä tai mihin molekyyliin peptidi sitoutuu (Ruoslahti ja Rajotte 2000). Interaktiivisuudesta johtuen osa jo löydetystä kudosspesifisistä peptideistä vaikuttaa kohdemolekyyliensä toimintaan (Ruoslahti ja Rajotte 2000, Ruoslahti 2000). Lisäksi on havaittu, että muodostamalla rekombinanttifuusioproteiini, jossa on sekä kudokseen hakeutuva peptidi että lääkemolekyyli, saadaan aikaan tehokkaampi vaikutus kuin yksittäisillä osatekijöillä (Järvinen ja Ruoslahti 2010).

Seulonnan etuna on myös se, että kun lupaava peptidi on tunnistettu, voidaan helposti analysoida muutkin kudokset kuin haluttu kohdekudos ja selvittää, onko kyseessä moneen eri kudokseen hakeutuva peptidi vai spesifisesti haluttuun kohteeseen hakeutuva peptidi. Bakteriofagikirjastoja seulottaessa on havaittu, että vain spesifisesti yhteen kohdekudokseen hakeutuvat peptidit nousevat seulassa esiin (Ruoslahti ja Rajotte 2000).

Vaikuttaa siltä, että menetelmä yhdistää positiivisen valinnan (peptidi saa bakteriofagin hakeutumaan kohdekudokseen) ja negatiivisen valinnan (bakteriofagi ei sitoudu epäspesifisesti) (Ruoslahti ja Rajotte 2000).

Tämän seulontamenetelmän haittapuoli on, ettei tiedetä, mihin peptidi kudoksessa hakeutuu: Jääkö se endoteelin sisäpintaan vai pääseekö pois verisuonesta parenkyymin? Aluksi ajateltiin, että peptidi sitoutuu verisuonistossa olevaan kohdemolekyyliin. Tätä ajatusta tukivat useat seikat: mm. peptidin sitoutuminen tapahtuu nopeasti, vain muutamissa minuuteissa. Lisäksi havaittiin, että bakteriofagi on verisuonessa, ei parenkyymissä, jokainen bakteriofagin tunnistettu reseptori oli verisuonessa ja kaikki tunnetut kasvaimen hakeutuvat bakteriofagit hakeutuivat myös muihin kasvaimiin. (Ruoslahti 2000.) Toisaalta on hyvä huomata, että bakteriofagin pinnalla ilmennetty, osana kalvoproteiinia oleva peptidi ei välttämättä käyttäyty verisuonistossa samalla lailla kuin pelkkä synteettinen peptidi, jolla on vain sama aminohappojärjestys.

Myöhemmin havaittiin peptidejä, jotka pystyvät tunkeutumaan parenkyymin. Esimerkiksi CAR-peptidin on osoitettu hakeutuvan solun sisään (Järvinen ja Ruoslahti 2007, Urakami ym. 2011) ja Lyp-1-peptidin imusuoniin (Laakkonen ym. 2008, Ruoslahti 2012). Yleisesti ottaen lääkeaineet eivät yksinään tunkeudu kovin syvälle kohdekudokseen (Ruoslahti ym. 2010) ja esimerkiksi syöpälääkkeet on tyypillisesti suunnattu syöpäsoluja, ei endoteelisoluja, vastaan. Ei siis auta, jos peptidi kuljettaa lääkemolekyylin vain oikean kudoksen verisuonistoon, vaan sen täytyy myös auttaa lääkemolekyyliä tunkeutumaan kudokseen tai ainakin olla estämättä tunkeutumista. Kysymykseksi nousee siis, miten tunnistaa ne peptidit, jotka pystyvät kudokseen hakeutumisen lisäksi tunkeutumaan kohdekudoksen parenkyymin.

Äskettäin on löydetty kuljetusjärjestelmä, joka saa peptidin tunkeutumaan kohdekudoksen parenkyymin. Järjestelmä on nimeltään C-end rule (CendR) ko. peptideissä olevan proteiinisekvenssin pohjalta. Peptidi, joka hakeutuu kohdekudokseen ja tunkeutuu sen parenkyymin koostuu kahdesta osasta, kohdekudosspesifisestä ja CendR-osasta. Jotkin kudokseen hakeutuvat peptidit sisältävät CendR-osan jo itsessään. CendR-peptidi pystyy kuljettamaan minkä tahansa lääkeaineen aktiivisesti kohdekudokseen, vaikka lääkeainetta ei ole fyysisesti liitetty peptidiin. (Teesalu ym. 2012, Ruoslahti ym. 2010, Toba et al. 2014.) Kudokseen hakeutuva ja solujen läpi menevä peptidi vetää siis mukanaan samanaikaisesti verenkierrossa olevat lääkeaineet. Tätä nimitetään sivustakatojaefektiksi (bystander effect) (Järvinen 2013). On havaittu, että vaikka CAR-peptidillä ei ole CendR-osaa, sillä on samanlainen kyky kuljettaa lääkeaineita kudokseen kuin CendR-osan sisältävillä peptideillä (Järvinen ja Ruoslahti 2007, Toba ym. 2014).

Kaiken sen perusteella, mitä tiedetään ihohaavan uudisverisuonista, verisuoniston postinumeroista ja eri kudoksiin spesifisesti hakeutuvista proteiineista, on oletettavaa löytää ihohaavan uudisverisuoniin hakeutuvia ja tunkeutuvia peptidejä. Jo mainitun CAR-peptidin on osoitettu hakeutuvan ja tunkeutuvan ihohaavan granulaatiokudokseen (Järvinen ja Ruoslahti 2007). Samassa yhteydessä löytyi toinen peptidi, CRK, joka

hakeutuu ihohaavaan, mutta ei tunkeudu kudokseen (Järvinen ja Ruoslahti 2007). Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia muutamien muiden aiemmissa analyyseissä lupaaviksi osoittautuneiden peptidien kykyä hakeutua ihohaavaan.

2. Aineistot ja menetelmät

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, hakeutuuko jokin tutkituista peptideistä ihohaavaan. Tutkitut peptidit olivat CRKDK (tCRK, truncated CRK), CRSTRSTKC (TKC), CKSVKNREC (REC) ja CERESTKIC (KIC). Professori Tero Järvinen ja akateemikko Erkki Ruoslahti valitsivat nämä peptidit käydessään läpi professori Järvisen vuosina 2003 – 2004 suorittamia bakteriofagikirjastoseulontoja (Järvinen ja Ruoslahti 2007). tCRK valittiin, koska alkuperäinen CRK-peptidi on ainoa tunnettu CendR-osan sisältävä peptidi, joka ei pysty tunkeutumaan solujen läpi (Agemy ym. 2010, Järvinen ja Ruoslahti 2007). Mahdollinen selitys tälle on, että CRK-peptidi on liian pieni tullakseen proteaasien pilkkomaksi, joten sen CendR-osa ei aktivoidu. Synteettisessä tCRK-peptidissä CendR-osa on valmiiksi aktiivisena.

Negatiivisena kontrollina käytettiin peptidiä, jossa kahden kysteiinin (C) välissä on seitsemän sattumanvaraista aminohappoa (CLLGKNNSC). Positiivisena kontrollina käytettiin kahta peptidiä, CARSKNKDC (CAR) ja CRKDKC (CRK). Näiden kahden peptidin on jo aiemmin todettu hakeutuvan ihohaavaan (Järvinen ja Ruoslahti 2007).

Tutkitut peptidit kloonattiin T7-bakteriofaagin pintaproteiiniin aikaisemmin kuvatun menetelmän mukaan. DNA-palat, jotka sisälsivät peptidin valmistamiseen tarvittavan nukleiinihappojärjestyksen, kloonattiin Novagenin T7Select415-1b bakteriofagiin (Teesalu ym. 2012). DNA-alukkeet syntetisoitiin 5'-pää fosforyloituna (Tag Copenhagen, Kööpenhamina, Tanska). Kloonattujen bakteriofagien aminohappojärjestys tutkittavan peptidin osalta varmistettiin sekvensoimalla bakteriofagien DNA.

Kaikissa kloonatuissa peptideissa tCRK-peptidiä lukuun ottamatta on seitsemän aminohappoa kahden kysteiinin välissä. Kysteiinien tioliryhmät (-SH) muodostavat rikkisillan toistensa välille, jolloin peptidi asettuu renkaaksi (sykliseksi peptidiksi) bakteriofagin pinnalle (Järvinen 2012).

Tutkimuksessa käytettiin eläinmallina hiiren ihohaavaa. Tutkimusta varten oli haettu ja saatu tarvittavat eläinkoeluvat Etelä-Suomen aluehallintoviraston eläinkoelautakunnalta. Tutkittavat eläimet olivat kaikki BALB/c-uroksia. Hiirille tehtiin anestesiassa karvojen ajelun ja ihon desinfioinnin jälkeen koepalanottimella (halkaisija 6 mm) neljä haavaa alaselkään. Anestesia-aineena käytettiin inhaloitavaa sevofluraania. Hiiret kipulääkittiin buprenorfiinilla haavoituksen yhteydessä sekä 12 tuntia ja tarvittaessa 24 tuntia haavoituksen jälkeen. Hiiret saivat liikkua heti anestesian loppumisen jälkeen. Haavojen annettiin parantua 5, 7 tai 14 vuorokautta. Haavoja ei peitetty, mutta haavoituksen jälkeen jokainen hiiri laitettiin häkkiin yksin. Hiiret kykenivät liikkumaan vapaasti heti anestesian väistyttyä.

Bakteriofageja sisältävää liuosta injektoidiin hiiren häntälaskimoon siten, että bakteriofagien kokonaismäärä oli 10^9 kappaletta. Liuoksen annettiin kiertää 7 minuuttia, jonka jälkeen hiiri nukutettiin inhaloitavalla sevofluraanilla sekä intraperitoneaalisesti injektoidulla medetomidini-ketamiiniliuoksella. Anestesiassa olevan hiiren verenkierto huuhdeltiin tyhjäksi bakteriofageista eli hiiri perfusoidiin, kun injektioista oli kulunut 12 minuuttia. Perfuusiovaiheessa huolehdittiin siitä, että ihohaavat eivät kontaminoidu hiiren verellä. (Teesalu ym. 2012.) Perfuusion jälkeen hiirestä irrotettiin näytteeksi ihohaavat ja tervettä ihoa.

Osasta 7 vuorokautta aikaisemmin haavoitetuista hiiristä irrotettiin kontrollielimiksi keuhkot, sydän, perna, munuainen ja maksa.

Kudosnäytteet hajotettiin ja pestiin. Näytteestä eristettiin bakteriofagit, jotka viljeltiin bakteriofagin toimittajan ohjeiden mukaan bakteriofagien määrän selvittämiseksi. Näytteestä saatujen bakteriofagien määrä suhteutettiin kudoksenäytteen massaan (kosteana).

Yhteen hiireen injektoidiin vain yhdenlaista peptidiä sisältäviä bakteriofageja. Erot eri peptidien välillä laskettiin vertaamalla samana päivänä operoiduista hiiristä eristettyjen bakteriofagipesäkkeiden määriä viljelymaljalla. Määrät laskettiin suhteessa negatiiviseen kontrolliin siten, että kyseisen päivän negatiivinen kontrolli sai aina arvon yksi. Eri päivinä operoiduista eläimistä saatujen bakteriofagien määriä vertailtiin näinä suhteellisina lukuina, sillä tuloksissa näkyvä epäspesifinen sitoutuminen saadaan näin paremmin hallintaan. Tilastoanalyysissä käytettiin SPSS-tilasto-ohjelmaa. Ryhmien välisten erojen tilastollinen merkittävyys tutkittiin Mann-Whitneyn testillä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin p-arvoa alle 0,05.

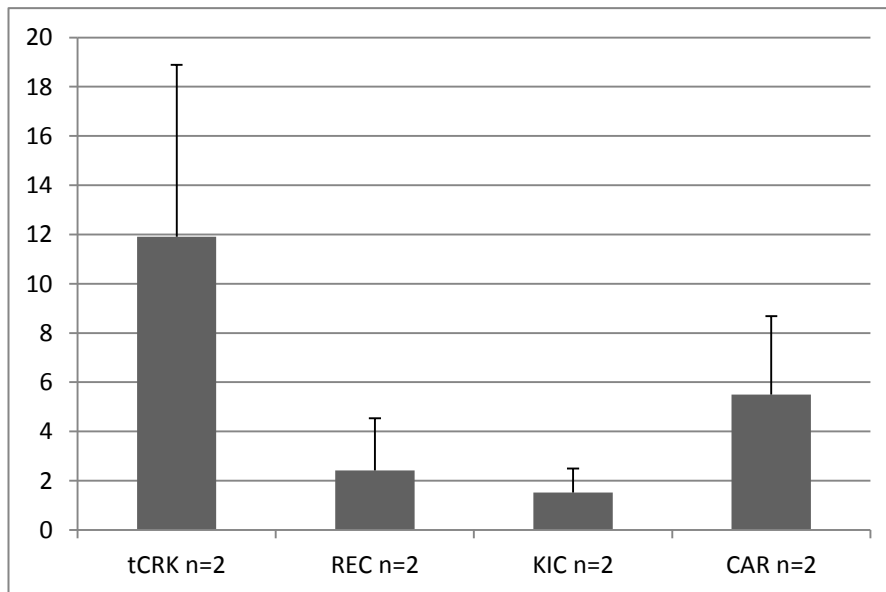
3. Tulokset

3.1 Peptidien kloonaminen

Tutkittavat peptidit tCRK, REC ja KIC kloonattiin T7Select415-1b bakteriofagin pintaproteiiniin. TKC-peptidin kloonaminen epäonnistui. Tutkittavien peptidien (tCRK, REC ja KIC) ja kontrollipeptidien (CRK, CAR ja negatiivinen kontrolli) aminohappojärjestykset varmistettiin sekvensoimalla tuotettujen kloonien aminohappojärjestys pintaproteiinin osalta.

3.2 Alustava analyysi

Alustavassa analyysissä katsottiin kaikkien tutkittavien peptidien hakeutuminen ihohaavaan seitsemäntenä haavoitusta seuranneena päivänä (kuva 1). Hakeutumista verrattiin positiivisena kontrollina toimineeseen CAR-peptidiin ja negatiiviseen kontrolliin. Alustavassa analyysissä ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja, luultavasti liittyen aineiston pienuuteen. Analyysin perusteella tCRK vaikutti lupaavalta, joten se valittiin jatkoanalyysiin.

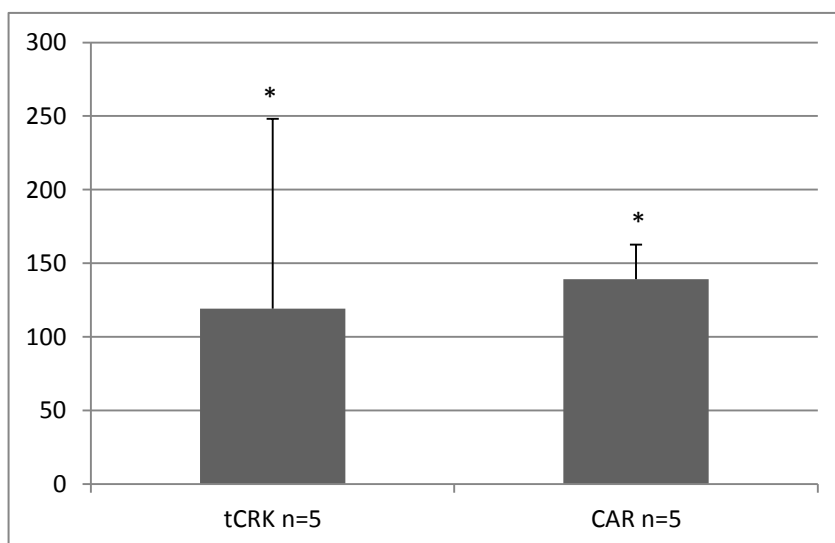


Kuva 1: Kaikkien tutkittavien peptidien hakeutuminen ihohaavaan (7 vuorokautta vanhat haavat) verrattuna negatiiviseen kontrolliin ja CAR-peptidiin. Negatiivisen kontrollin arvo on 1 ja n=2. Ei tilastollisesti merkittäviä eroja ryhmien välillä.

3.3 Hakeutuminen ihohaavaan

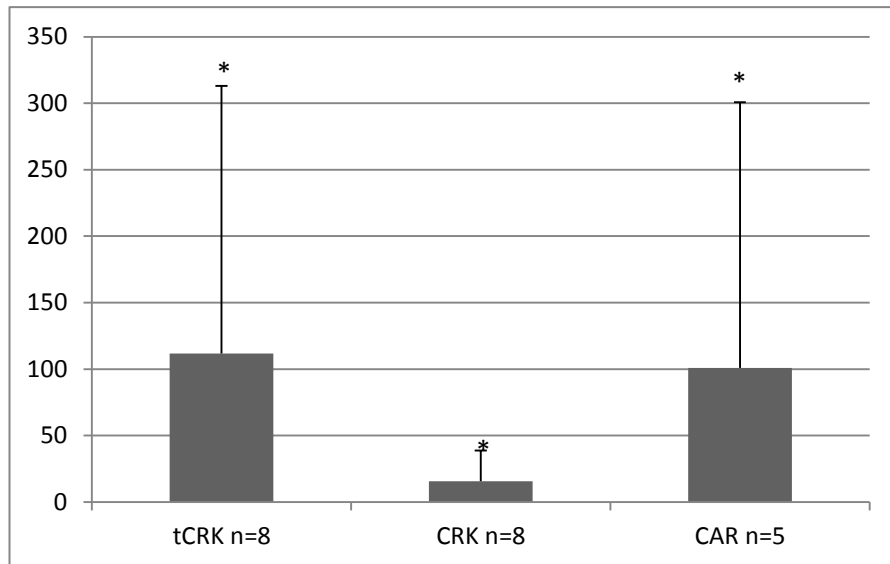
tCRK-peptidin hakeutumista ihohaavaan verrattiin kontrollipeptideihin eri-ikäisissä haavoissa. 7 ja 14 vuorokautta vanhoissa haavoissa verrattiin CAR- ja CRK-peptidiin ja 5 vuorokautta vanhoissa haavoissa vain CAR-peptidiin, sillä sen on osoitettu hakeutuman 5 vuorokautta vanhaan haavaan tehokkaammin kuin CRK (Järvinen ja Ruoslahti 2007).

5 vuorokautta vanhan haavan analyysissä huomattiin, että sekä CAR:n että tCRK:n määrä erosi tilastollisesti merkittävästi negatiivisesta kontrollista. Tilastollisesti merkittävää eroa ei CAR:n ja tCRK:n välillä ei havaittu.



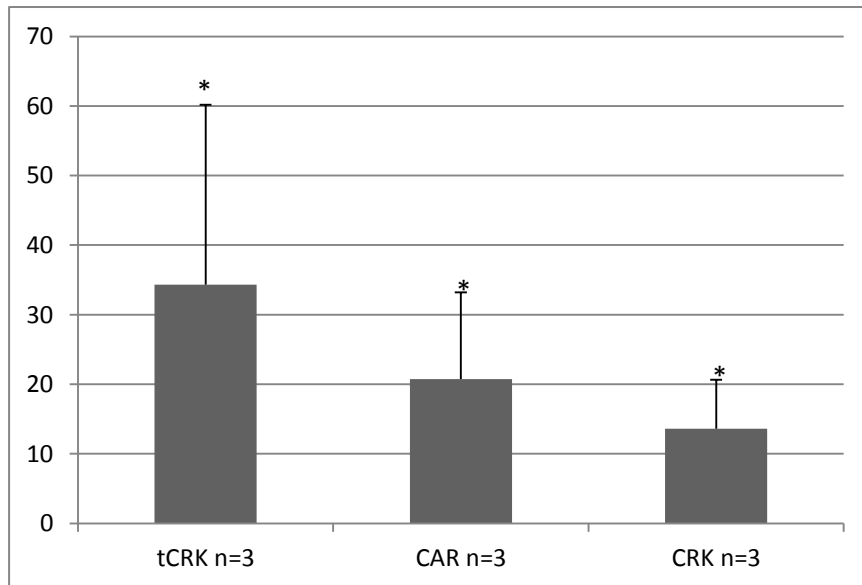
Kuva 2: tCRK- ja CAR-peptidien hakeutuminen 5 vuorokautta vanhaan ihoaavaan. Negatiivisen kontrollin arvo on 1 ja n=5. *p < 0,05.

7 vuorokautta vanhan haavan analyysissä havaittiin, että kaikkien peptidien (tCRK, CRK ja CAR) määrä erosi tilastollisesti merkittävästi negatiivisesta kontrollista (kuva 3). Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkittäviä eroja.



Kuva 3: tCRK-, CRK- ja CAR-peptidien hakeutuminen 7 vuorokautta vanhaan ihoaavaan. Negatiivisen kontrollin arvo on 1 ja n=7. *p < 0,05.

14 vuorokautta vanhan haavan analyysin perusteella todettiin, että tutkittujen peptidien (tCRK, CAR ja CRK) määrä erosi tilastollisesti merkittävästi negatiivisesta kontrollista (kuva 4). Tilastollisesti merkittäviä eroja ei ryhmien välillä ollut.



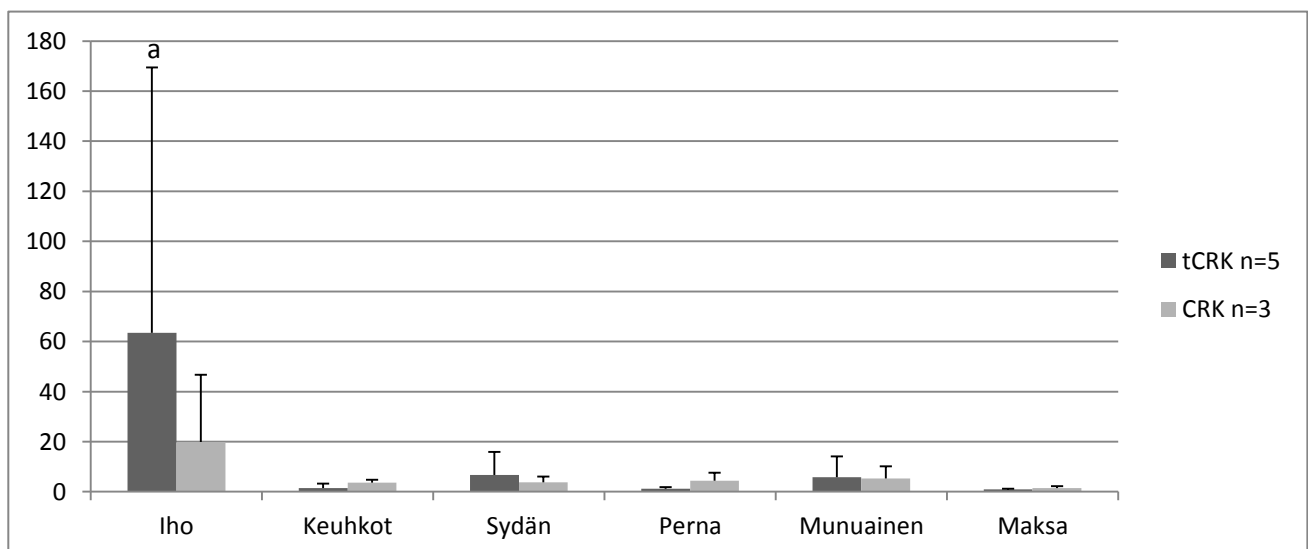
Kuva 4: tCRK-, CRK- ja CAR-peptidien hakeutuminen 14 vuorokautta vanhaan ihohaavaan. Negatiivisen kontrollin arvo on 1 ja n=5. *p < 0,05.

Samasta datasta analysoitiin myös, miten yksittäinen peptidi käyttäytyy suhteessa haavan ikään (kuvaajia ei näytetä). Kuvaajat antoivat viitteitä siitä, että sekä tCRK että CAR hakeutuvat heikommin 14 vuorokautta vanhaan haavaan kuin tuoreempiin haavoihin. Tilastollisesti merkittäviä eroja ei eri aikapisteiden välillä ollut.

3.4 Kontrollielimet

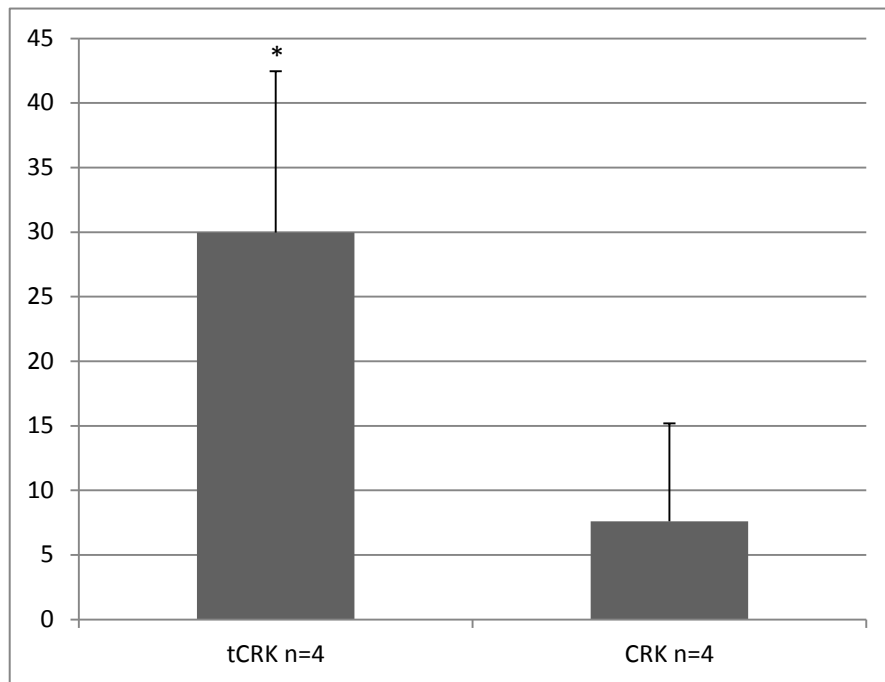
Kontrollieliminä tutkimuksessa käytettiin ihoa, keuhkoja, sydäntä, pernaa, munuaisia ja maksaa.

Kontrollielimet tutkittiin tCRK- ja CRK- peptidien osalta, tosin CAR- ja CRK-peptidien haavaspesifisyys oli jo etukäteen tiedossa (Järvinen ja Ruoslahti 2007). Kontrollielinten analyysi näkyy kuvassa 5. Tilastollisesti merkittäviä eroja ei ole, mutta tCRK:n hakeutuminen ihoon eroaa kontrolli-peptidistä p-arvolla 0,06.



Kuva 5: tCRK- ja CRK-peptidin hakeutuminen kontrollielimiin. Negatiivisen kontrollin arvo on 1 ja n=6. Tilastollisesti merkittäviä eroja ei ole. ^a p = 0,06.

Kontrollielinanalyysin pohjalta näytti siltä, että tCRK hakeutuu ihoon spesifisesti. Asian varmistamiseksi ja harhan mahdollisuuden pienentämiseksi tutkittiin tCRK- ja CRK-peptidin hakeutuminen haavoittamattoman eläimen ihoon. Tässä havaittiin, että tCRK:n määrä erosi tilastollisesti merkittävästi negatiivisesta kontrollista. tCRK:n ja CRK:n keskinäinen ero jäi tilastollisesti merkityksettömäksi (p = 0,057).



Kuva 6: tCRK- ja CRK-peptidin hakeutuminen haavoittamattoman eläimen ihoon. Negatiivisen kontrollin arvo on 1 ja n=5. *p < 0,05.

4. Pohdinta

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että tCRK-peptidi (CRKDK) hakeutuu hiiren ihohaavaan niin 5, 7 kuin 14 vuorokautta vanhoissa haavoissa. Merkittävää eroa aikaisemmin löydettyihin ihohaavaan hakeutuviin peptideihin CAR ja CRK ei ollut. Lisäksi tCRK-peptidin todettiin hakeutuvan normaaliin, haavoittamattomaan ihoon. Kyseessä voisi olla artefakta, mutta tällöin kaikkien peptidien, myös negatiivisen kontrollin, pitäisi käyttäytyä samalla lailla, jolloin merkittävää eroa tCRK-peptidin ja negatiivisen kontrollin välillä ei olisi. Normaaliin ihoon tapahtuva spesifinen hakeutuminen pyrittiin varmistamaan tutkimalla hakeutuminen haavoittamattomien hiirien ihoon. Tällöin saatiin esiin tilastollisesti merkittävä ero tCRK-peptidin ja negatiivisen kontrollin hakeutumisessa. Ero tCRK:n ja CRK:n välillä jäi niukasti epämerkittäväksi.

Käytetty bakteriofagiseulontamenetelmä on hyvin pitkälle käsityötä ja vaatii opettelua. Vaikka opinnäytetyön tekijä harjoitteli mm. häntälaskimoinjektion antamista etukäteen, taitojen kehittymistä

tapahtui silti tutkimuksen edetessä. Tämä näkyi mm. hajonnan vähenemisenä viimeisissä analyyseissä. Jos taitojen kehittyminen vaikutti tutkimuksen tuloksiin, vaikutus on mitä todennäköisimmin hajontaa lisäävä ja luo siten virhettä sellaiseen suuntaan, että olemassa olevat erot jäävät havaitsematta. Tämä ei ainakaan vähennä saatujen tilastollisesti merkittäviksi osoittautuneiden tulosten luotettavuutta.

Tutkimuksen kontrollipeptideistä CAR on tunnettu ihon granulaatiokudokseen tunkeutuva peptidi, kun taas CRK-peptidin tiedetään olevan tunkeutumiseen kykenemätön (Järvinen ja Ruoslahti 2007). Alustavissa tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että tCRK ei tunkeudu granulaatiokudokseen (Prince, Valmari ja Järvinen, julkaisematon havainto). Tämä ei ole kovin yllättävää, sillä tCRK on rakenteeltaan hyvin lähellä CRK-peptidiä.

4.1 Arpeutuminen

Tunnistamalla ihohaavan granulaatiokudoksen verisuonistoon hakeutuvia peptidejä, voidaan paitsi saada tietoa suonistolle spesifisistä molekyyleistä, myös kehittää terapeutisia menetelmiä eri haavaongelmiin. Haavan paranemiseen liittyvät ongelmat voidaan jakaa karkeasti kahteen osaan. Haavan paraneminen on heikentynyt, kuten esimerkiksi diabeettisissa haavoissa, laskimohaavoissa ja painehaavoissa (Nauta ym. 2011, Miller ja Nanchahal 2005, Tonnesen ym. 2000). Toinen vaihtoehto on, että haava paranee liian tehokkaasti eli hypertrofioituu tai muodostaa keloidin (Nauta ym. 2011, Miller ja Nanchahal 2005). Myös niissä tapauksissa, joissa haava paranee normaalisti, syntyy arpi, jonka mekaaniset ja molekylaariset ominaisuudet eivät ole samanlaiset kuin vahingoittumattoman ihon (Nauta ym. 2011, Li ym. 2007, Miller ja Nanchahal 2005).

Alkion ja sikiön ihohaavat paranevat arpeutumatta raskauden loppuvaiheelle saakka (Nauta ym. 2011, Miller ja Nanchahal 2005, Lorenz ja Adzick 1993). Lisäksi aikuisellakin suun limakalvon pinnalliset haavat paranevat arpeutumatta (Miller ja Nanchahal 2005) ja muut limakalvohaavat nopeammin ja muodostaen vähemmän arpea kuin ihohaavat (Nauta ym. 2011). Sikiö ja sen ihohaavat ovat kovin erilaisessa ympäristössä mm. lämpötilan, kosteuden ja steriliateetin suhteen kuin aikuisen ihohaavat, mutta se ei vaikuta olevan ratkaisevaa arpeutumisen kannalta (Lorenz ja Adzick 1993). Sikiön ihohaavoissa on vähemmän tulehdussoluja, vähemmän angiogeneesiä, enemmän hyaluronihappoa, suhteessa enemmän tyypin III kuin tyypin I kollageenia, matriksin metalloproteiinaasien ilmeneminen on runsaampaa ja TGF- β :n eri muotojen keskinäiset suhteet ovat erilaiset kuin aikuisella (DiPietro 2013, Nauta ym. 2011, Miller ja Nanchahal 2005, Lorenz ja Adzick 1993).

Suun limakalvohaavojen vähäisen arpeutumistaipumuksen takana ajatellaan olevan vaimeampi tulehdusvaste ja vähäisempi määrä uudisverisuonia kuin ihohaavoissa (Nauta ym. 2011). Vaikuttaa siltä, että suun limakalvohaavoissa tapahtuu vähemmän haavan reunojen vetäytymistä toisiaan kohti kuin ihohaavoissa (Miller ja Nanchahal 2005). Tulehdusvasteen osuutta haavoihin on tutkittu mm. PU.1-poistogeenisillä

hiirillä, jotka ovat kykenemättömiä saamaan tulehdusreaktiota aikaan makrofagien ja neutrofiilien puutteen vuoksi. Näiden hiirten haavat paranevat arpeutumatta. (Nauta ym. 2011, Miller ja Nanchahal 2005.)

Angiogeneesin on havaittu olevan vähäisempää sikiön ihohaavoissa ja suun limakalvon haavoissa kuin aikuisen ihohaavoissa. Lisäksi hypertrofisissa arvissa kapillaariverisuonia on tiheämmässä kuin normaaleissa arvissa. Angiogeneesin ja arpeutumisen yhteyden on ajateltu liittyvän siihen, että vaurioalueelle ensimmäisinä syntyvät verisuonet toimivat huonosti. Ne ovat mutkikkaita ja vuotavia ja muistuttavat kasvainten verisuonia. Toisaalta on ajateltu, että monet proangiogeneettiset tekijät vaikuttavat myös fibroblasteihin ja muihin soluihin lisäten vaurioalueen fibrotisoitumista. Tämä tarkoittaa, että angiogeneesi ja arpeutuminen ovat enemmän rinnakkaisia kuin kausaalisia ilmiöitä. (DiPietro 2013.)

Arpeutumisen estämiseksi on tehty useita kokeiluja. Hyaluronihapon ja sen tuotantoa lisääviä saponiinien annostelua haavan pinnalle on kokeiltu (Nauta ym. 2011). Tulehdusvälittäjäaineita muodostavan syklo-oxygenaasi-2-entsyymin (COX-2) toiminnan hillitsemisen on havaittu vähentävän arpeutumista (Miller ja Nanchahal 2005). Angiogeneesiä ja fibrotisoitumista lisäävän adenosini-A2A-reseptorin toiminnan farmakologisen estämisen on havaittu vähentävän angiogeneesiä ja arven muodostumista (Perez-Aso ym. 2012). Hiljattain on havaittu, että ihmisen napanuorasta eristettyjen Whartonin hyytelön kantasolujen (WJ-MS) siirtäminen hiiren ihohaavaan vähentää arpeutumista. Tehokkain vaikutus saatiin kantasolujen ja soluttoman sikiökalvon yhdistelmällä. (Sabapathy ym. 2014.)

TGF- β -kasvutekijä on arven muodostuksen kannalta keskeinen välittäjäaine. Sen eri muotoihin on vaikutettu monella tavalla, mm. dekoriinilla (Nauta ym. 2011). Dekoriini on pieni proteoglykaani, joka vähentää fibrotisoitumista kudoksissa rajoittamalla TGF- β :n vaikutusta sitoutumalla siihen ja estämällä tämän kasvutekijän vaikutuksen soluihin (Nauta ym. 2011). CAR-peptidiin liitetyn dekoriinin on havaittu tehostavan haavan paranemista ja vähentävän arpeutumista enemmän kuin dekoriinin yksinään (Järvinen ja Ruoslahti 2010).

4.2 Menetelmän sovelluksia

Tässä opinnäytetyössä käytetyllä *in vivo* -bakteriofagiseulontamenetelmällä on jo aikaisemmin tunnistettu eri kudoksiin kuten keuhkoihin, eturauhaseen, sydämeen, aivoihin, uudisverisuoniin, imusuoniin, yleisesti kasvaimiin, veritulppaan sekä haavaan hakeutuvia peptidejä (Teesalu ym. 2012, Ruoslahti 2002b).

Bakteriofagikirjastoon perustuva seulonta on toteutettu myös ihmisillä tutkimuksessa, jossa syöpäpotilaisiin injektointi bakteriofagikirjasto sisälsi vasta-aineiden kaltaisia scFv-fuusioproteiineja. Tutkimuksessa kirjaston injektointi ei aiheuttanut haittavaikutuksia ja yhtä lukuun ottamatta kaikkien tutkittujen potilaiden kasvaimista löydettiin kasvaimen sitoutuneita bakteriofageja. (Shukla ym. 2013.)

Ihohaavaan hakeutuvia peptidejä seulottaessa kannattaa keskittyä sellaisiin, jotka pystyvät tunkeutumaan verisuonista ympäröivään granulaatiokudokseen. CendR-osan liittäminen tunnettuihin ihohaavaan hakeutuviin mutta sinne tunkeutumattomiin peptideihin on yksi mahdollinen tapa yrittää kehittää ihohaavaan tunkeutuva peptidi. On havaittu, että CendR-osan liittäminen kasvaimiin hakeutuvaan RGD-peptidiin saa aikaan tunkeutumisen kohdekudokseen ja kymmenkertaistaa peptidin kyvyn kuljettaa lääkeainetta kasvaimeen (Sugahara ym. 2009). Toisaalta ainakin CAR-peptidi pystyy tunkeutumaan granulaatiokudokseen ilman CendR-osaa (Järvinen ja Ruoslahti 2007) ja pystyy vastaavalla tavalla kuljettamaan lääkeaineita kohdekudokseen ilman, että lääkeaine on konjugoitu peptidiin (Toba ym. 2014). Lisää tällaisia peptidejä olisi nykyistä helpompi löytää kehittämällä bakteriofagikirjastoseulontaa sellaiseksi, että se tunnistaa vain peptidejä, jotka sekä hakeutuvat että tunkeutuvat kudokseen.

Kudosspesifisten peptidien kyvystä tehostaa lääkeaineen vaikutusta kohdekudoksessa on saatu vahvoja viitteitä eläinkokeissa (Urakami 2011, Järvinen ja Ruoslahti 2010, Ruoslahti ym. 2010). Kenties tulevaisuudessa suurimpaan osaan suonensisäisesti annosteltavista lääkkeistä liitetään mukaan peptidi, joka aiheuttaa lääkeaineen kerääntymisen haluttuun paikkaan. Toinen mahdollinen sovellus kudosspesifisille peptideille on diagnostiikka. Diagnostisessa tarkoituksessa käytettävän peptidin ei välttämättä tarvitsisi tunkeutua kudokseen, vaan pelkkä hakeutuminen riittäisi. RGD-peptidiä on jo käytetty menestyksekkäästi kuljettamaan diagnostisia koettimia kasvaimiin (Ruoslahti ym. 2010, Sugahara 2009).

Viitteet

Agemy L, Sugahara K, Kotamraju VR, ym. Nanoparticle-induced vascular blockade in human prostate cancer. *Blood* 116;2847-56

Bayless K, Johnson G. Role of the Cytoskeleton in formation and maintenance of angiogenic sprouts. *J Vasc Res* 2011;48:369-85

DiPietro L. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:87-91

Gieringer M, Gosepaht J, Naim R. Radiotherapy and wound healing: Principles, management and prospects (Review). *Oncol Rep* 2011;26:299-307

Hughes C. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15:204-9

Johnstone C, Farley A, Hendry C. The physiological basics of wound healing. *Nurs Stand* 2005;19:59-65

Järvinen T. Kohti kudosspesifistä lääkehoitoa. *Duodecim* 2013;129:327-9

Järvinen T. Design of target-seeking antifibrotic compounds. *Method Enzymol* 2012;509:243-61

Järvinen T, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:21671-21676

Järvinen T, Ruoslahti E. Molecular changes in the vasculature of injured tissues. *Am J Pathol* 2007;171:702-11

- Laakkonen P, Zhang L, Ruoslahti E. Peptide targeting of tumor lymph vessels. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1131:37-43
- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:9-18
- Li J, Zhang Y, Kirsner R. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 2003;60:107-14
- Lorenz H, Adzick N. Scarless skin wound repair in the fetus. *West J Med* 1993;159:350-5
- Miller M, Nanchahal J. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. *Biodrugs* 2005;19:363-81
- Nauta A, Gurtner G, Longaker M. Wound healing and regenerative strategies. *Oral Dis* 2011;541-9
- Perez-Aso M, Chiriboga L, Cronstein B. Pharmacological blockade of adenosine A2A receptors diminishes scarring. *FASEB J* 2012;26:4254-63
- Porkka K, Laakkonen P. Ligandomiikka – työkalu kohdennetun hoidon kehitykseen. *Duodecim* 2002;118:1185-94
- Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002a;2:83-90
- Ruoslahti E. Drug targeting to specific vascular sites. *Drug Discov Today* 2002b;7:1138-43
- Ruoslahti E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol* 2000;10:435-42
- Ruoslahti E, Bhatia S, Sailor M. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol* 2010;188:759-68
- Ruoslahti E, Rajotte D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:813-827
- Sabapathy V, Sundaram B, VM S, ym. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth. *PLoS ONE* 2014;9:1-10
- Shukla G, Krag D, Peletskaya E, ym. Intravenous infusion of phage-displayed antibody library in human cancer patients: enrichment and cancer-specificity of tumor-homing phage-antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:1397-410
- Singer A, Clark R. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46
- Sugahara K, Teesalu T, Karmali PP, ym. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* 2009;16:510-20
- Teesalu T, Sugahara K, Ruoslahti E. Mapping of vascular ZIP codes by phage display. *Method Enzymol* 2012;503:35-56
- Toba M, Alzoubi A, O'Neill K, ym. A novel vascular homing peptide strategy to selectively enhance pulmonary drug efficacy in pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 2014;184:369-75
- Tonnesen M, Feng X, Clark R. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:40-6

Urakami T, Järvinen T, Toba M, ym. Peptide-directed highly selective targeting of pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 2011;178:2489-95